

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20620101151448

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

龙眼核多酚的碱提酸沉提取工艺
及其成分鉴定

Studies on Alkaline Extraction and Acid Precipitation
Process of Polyphenols from Longan Seeds and
Identification of the Extracts

李翔南

指导教师姓名: 何 宁 教 授

李清彪 教 授

专 业 名 称: 化 学 工 程

论文提交日期: 2013 年 月

论文答辩日期: 2013 年 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

为了更合理有效的开发利用龙眼核多酚资源,本文尝试采用碱提酸沉工艺提取龙眼核多酚,初步鉴定了龙眼核多酚提取物的主要成分,对其抗氧化和自由基清除能力进行了评价。

选择低成本,浸取效果较好的磷酸钠缓冲液为浸取溶剂,确定了龙眼核前处理的最优干燥条件为 50 °C 下干燥 30 h,利用响应面法对浸取工艺进行优化:磷酸钠缓冲液 pH=11、浓度 10 mM,浸取温度 70 °C,料液比 1:40,浸取时间 25 min。在此工艺条件下龙眼核多酚的浸出率为 46.86 ± 0.43 mg/g,达到理论预测值的 103.67%,同时达到水/乙醇浸提工艺的 98.17%。

对龙眼核多酚的酸法沉淀分离工艺进行了优化,得到了最优的工艺条件为:将过滤后的浸出液在真空条件下浓缩 5 倍,向浓缩液中加入浓度为 0.55 M 的盐酸,浓缩液与酸液体积比为 5:1,室温下静置沉淀,最大分离率可达 65.29 ± 0.38 %。利用紫外可见光谱和高效液相色谱对沉淀分析表明,其中富集的多酚主要为水解类多酚中的鞣花单宁。多酚的最大沉淀量在 pH=3 时达到,而不同 pH 值下的沉淀片段中的多酚组成基本一致。

对通过碱提酸沉工艺得到的龙眼核多酚提取物分析显示,提取物收率为 58.29 ± 3.77 mg/g (干基实重),其中:多酚 378.09 ± 8.40 mg/g,蛋白含量 496.93 ± 17.42 mg/g,糖类 321.03 ± 7.02 mg/g,黄酮 487.66 ± 4.22 mg/g。多酚收率为 22.04 ± 1.95 mg/g (干基没食子酸当量)。红外光谱分析显示,龙眼核多酚提取物与水解类多酚单宁酸的红外吸收光谱较为接近,并从电喷雾电离质谱中发现了与水解类多酚鞣花酸及鞣花酸戊糖苷一致的碎片峰。多酚提取物的总抗氧化能力为 307.80 ± 10.36 mg/g (FRAP 值,抗坏血酸对照),对三种自由基 ABTS \cdot^+ 、DPPH \cdot 和 \cdot OH 的 $SC_{50(PC)}$ (以多酚含量计算)分别为 0.057 mg/mL、0.185 mg/mL 和 0.0997 mg/mL,同时对照品抗坏血酸的 SC_{50} 分别为 0.076 mg/mL、0.158 mg/mL 和 0.253 mg/mL。

关键词: 龙眼核; 多酚; 提取; 碱提酸沉; 抗氧化; 自由基清除

ABSTRACT

A process of alkaline extraction and acid precipitation was adopted in this paper in an attempt to extract polyphenols from longan seeds. The process was optimized and the components were preliminarily identified. The antioxidant activity and free radical scavenging capacity of longan seeds polyphenols were evaluated finally.

Sodium phosphate buffer, as a low-cost solvent with better extraction capacity, was chosen for longan seeds polyphenol extraction. The optimal drying condition for the pre-treatment of longan seeds was determined to be 30 hours' drying at 50 °C. By using response surface methodology the extraction conditions with phosphate buffer solution was determined: the concentration of sodium phosphate buffer was 10 mM, pH=11, solid-liquid ratio was 1 : 40. The extraction was conducted at 70 °C for 25 min. The polyphenol yield was 46.86 ± 0.43 mg/g under the optimized conditions, comparable to the model predicted value of 103.67 % and 98.17 % of the aqueous ethanol process.

The acid precipitation process of longan seed polyphenols was optimized. 0.55 M hydrochloric acid was added to 5 times concentrated filtered alkaline extract, left at room temperature. Maximum precipitation efficiency of 65.29 ± 0.38 % was obtained. With UV-visible spectroscopy and HPLC analysis, polyphenols enriched in the precipitate was mainly ellagitannins which belongs to hydrolysable polyphenols. The maximum amount of polyphenol precipitant was reached at pH 3. However, consistent polyphenol compositions were indicated in different precipitate fractions at different pH.

With the process of alkaline extraction and acid precipitation, longan seed polyphenol extraction yield was 58.29 ± 3.77 mg/g (dry solid weight), in which polyphenols, proteins, carbohydrates and flavonoids were 378.09 ± 8.40 mg/g, 496.93 ± 17.42 mg/g, 321.03 ± 7.02 mg/g and 487.66 ± 4.22 mg/g, respectively. The polyphenols yield was 22.04 ± 1.95 mg/g (dry weight basis and gallic acid

equivalents). The infrared spectrum analysis showed that the absorption spectrum of longan polyphenol extracts was similar with tannin acid which belongs to hydrolysable polyphenols. Two of the most intense fragment peaks in the negative ionization mass spectrometry of longan seed polyphenol extracts were consistent with the major fragments of ellagic acid and its pentoside. The total antioxidant capacity of the extracts was 307.80 ± 10.36 mg/g (FRAP value, ascorbic acid control), the SC_{50} to three radical $ABTS^{\cdot+}$, $DPPH^{\cdot}$ and $\cdot OH$ (calculated by polyphenol content) were 0.057 mg/mL, 0.185 mg/mL and 0.0997 mg / mL, while for ascorbic acid were 0.076 mg / mL, 0.158 mg / mL and 0.253 mg / mL.

Keywords: Longan seeds; polyphenols; extraction; alkaline extraction and acid precipitation; antioxidant; radical scavenging

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 龙眼概述	1
1.1.1 龙眼简介	1
1.1.2 龙眼核简介	2
1.2 龙眼核的研究现状	2
1.2.1 龙眼核淀粉的提取利用	2
1.2.2 龙眼核脂肪酸的提取利用	3
1.2.3 龙眼核多酚的提取分离及抗氧化能力	4
1.2.3 其他龙眼核天然产物及活性的研究	6
1.3 植物多酚	7
1.3.1 植物多酚简介	7
1.3.2 植物多酚的提取工艺	8
1.3.2 植物多酚的分离纯化工艺	12
1.3.3 碱提酸沉工艺	14
1.3.4 植物多酚的定量和鉴定	15
1.4 植物多酚的生物活性	17
1.4.1 多酚的抗氧化及自由基清除活性	17
1.4.2 抗氧化及自由基清除活性的评价方法	18
1.5 本论文的研究内容和意义	19
第二章 龙眼核多酚浸取工艺的研究	21
2.1 引言	21
2.2 实验材料与仪器	21
2.2.1 实验材料	21
2.2.2 实验试剂	21
2.2.3 实验仪器	21
2.3 实验方法	22

2.3.1 龙眼核多酚的浸取.....	22
2.3.2 多酚含量测定.....	22
2.3.3 多酚浸取工艺溶剂系统的选择.....	23
2.3.4 紫外吸收光谱.....	23
2.3.5 龙眼核的前处理.....	23
2.3.6 磷酸钠缓冲液 pH 值对多酚浸出率的影响.....	24
2.3.7 磷酸钠缓冲液浓度对多酚浸出率的影响.....	24
2.3.8 浸取温度对多酚浸出率的影响.....	24
2.3.9 料液比对多酚浸出率的影响.....	24
2.3.10 浸取时间的影响.....	24
2.3.11 响应面法优化龙眼核多酚浸取工艺.....	24
2.4 结果与讨论.....	25
2.4.1 多酚检测方法的建立.....	25
2.4.2 不同溶剂系统对浸出率的影响.....	26
2.4.3 不同溶剂浸出液的紫外吸收光谱.....	27
2.4.4 不同干燥条件对多酚浸出率的影响.....	28
2.4.5 磷酸钠缓冲液 pH 的影响.....	30
2.4.6 磷酸钠缓冲液浓度对多酚浸出率的影响.....	31
2.4.7 浸取温度对多酚浸出率的影响.....	32
2.4.8 料液比对多酚浸出率的影响.....	33
2.4.9 浸取时间的影响.....	34
2.4.10 龙眼核多酚浸取工艺的响应面优化实验.....	35
2.4.11 响应面优化结果的试验验证.....	42
2.5 小结.....	42
第三章 龙眼核多酚酸法沉淀分离工艺的研究.....	43
3.1 引言.....	43
3.2 实验材料与仪器.....	43
3.2.1 实验试剂.....	43
3.2.2 实验仪器.....	43

3.3 实验方法	43
3.3.1 龙眼核浸出液的浓缩.....	43
3.3.2 龙眼核浸出液浓缩倍数对酸法沉淀分离过程的影响	44
3.3.3 不同种类酸的沉淀分离过程.....	44
3.3.4 紫外吸收光谱.....	44
3.3.5 高效液相色谱分析.....	44
3.3.6 pH 值对酸法沉淀分离过程的影响.....	45
3.3.7 pH 值控制的沉淀片段分离.....	45
3.4 结果与讨论	46
3.4.1 浸出液浓缩对多酚含量的影响.....	46
3.4.2 浸出液浓缩对酸法沉淀分离过程的影响.....	46
3.4.3 酸种类的不同对沉淀分离过程的影响.....	48
3.4.4 紫外吸收光谱对比.....	49
3.4.5 高效液相色谱分析.....	50
3.4.6 酸法沉淀分离过程中 pH 值的变化.....	51
3.4.7 不同 pH 值沉淀片段的紫外吸收光谱对比.....	52
3.4.8 不同 pH 值沉淀片段的高效液相色谱分析对比.....	53
3.5 小结	55
第四章 龙眼核多酚成分的初步鉴定及抗氧化活性的研究	56
4.1 引言	56
4.2 实验材料与仪器	56
4.2.1 实验试剂	56
4.2.2 实验仪器	56
4.3 实验方法	56
4.3.1 分离产物处理.....	56
4.3.2 总糖含量测定.....	56
4.3.3 蛋白含量测定.....	57
4.3.4 黄酮含量测定.....	57
4.3.5 总抗氧化能力测定.....	57

4.3.6 红外光谱分析.....	58
4.3.7 电喷雾电离质谱分析.....	58
4.3.8 ABTS 阳离子自由基清除能力的测定.....	58
4.3.9 DPPH 自由基清除能力的测定	59
4.3.10 羟基自由基清除能力的测定.....	59
4.4 结果与讨论.....	59
4.4.1 上多酚提取物收率、成分含量及抗氧化能力分析.....	59
4.4.2 不同 pH 值沉淀片段的收率、各成分含量及总抗氧化能力的对比.....	60
4.4.3 FRAP 值与多酚含量的相关性.....	61
4.4.4 龙眼核提取物的红外光谱分析.....	62
4.4.5 龙眼核提取物的电喷雾电离质谱分析.....	64
4.4.6 龙眼核提取物对 ABTS 阳离子自由基的清除能力.....	65
4.4.7 龙眼核提取物对羟基自由基的清除能力.....	67
4.5 小结.....	68
结论与建议	69
参考文献	71
附 录	85
在学期间的科研成果	92
致 谢	93

CONTENTS

CHAPTER I GENERAL INTRODUCTION.....	1
1.1 Overview of Longan.....	1
1.1.1 Introduction of Longan	1
1.1.2 Introduction of Longan Seeds	2
1.2 Research Status of Longan Seeds.....	2
1.2.1 Extraction and Utilization of Starch.....	2
1.2.2 Extraction and Utilization of Fatty Acid	3
1.2.3 Extraction and Separation of Polyphenols and their Antioxidant Capacity	4
1.2.4 Other Natural Products and Their Activity	6
1.3 Plant Polyphenols	7
1.3.1 Introduction of Plant Polyphenols.....	7
1.3.2 Extraction of Plant Polyphenols.....	8
1.3.2 Purification of Plant Polyphenols	12
1.3.3 Alkaline Extraction and Acid Precipitation Process.....	14
1.3.4 Quantification and Identification of Plant Polyphenols	15
1.4 The Biological Activity of Plant Polyphenols.....	17
1.4.1 The Antioxidant and Free Adical Acavenging Activity Polyphenols.....	17
1.4.2 Evaluation Methods of Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity	18
1.5 The Purposes and Contents of this Research Subject.....	19
CHAPTER II EXTRACTION OF LONGAN SEED POLYPHENOLS.....	21
2.1 Introduction.....	21
2.2 Materials and Apparatus.....	21
2.2.1 Materials	21
2.2.2 Reagents.....	21
2.2.3 Apparatus	21
2.3 Methods.....	21

2.3.1 Extraction of Polyphenols.....	22
2.3.2 Determination of Polyphenol Content	22
2.3.3 Selection of Polyphenol Extraction Solvent System.....	23
2.3.4 UV Absorption Spectrum.....	23
2.3.5 Pre-treatment of Longan Seeds	23
2.3.6 Influence of PB pH to the Extraction Yield	24
2.3.7 Influence of PB Concentration to the Extraction Yield.....	24
2.3.8 Influence of Temperature to the Extraction Yield	24
2.3.9 Influence of Solid-liquid Ratio to the Extraction Yield	24
2.3.10 Influence of Extraction Time	24
2.3.11 Response Surface Optimization of the Extraction Process	24
2.4 Results and Discussion.....	25
2.4.1 Establishment of Polyphenol Determination Method	25
2.4.2 Effects of Different Solvent on Extractive Capacity	26
2.4.3 UV Absorption Spectrum of Extracts with Different Solvents	27
2.4.4 Effects of Different Drying Conditions on Extration Yield	28
2.4.5 Influence of PB pH on the Extraction Effects.....	30
2.4.6 Influence of PB Concentration on the Extraction Effects	31
2.4.7 Influence of Temperature on the Extraction Effects.....	32
2.4.8 Influence of Solid-liquid Ratio t on the Extraction Effects.....	33
2.4.9 Influence of Extraction Time	34
2.4.10 The Experiment of Response Surface Optimization	35
2.4.11 Experimental Verification of the Result	42
2.5 Conclusions.....	42
 CHAPTER III SEPARATION OF LONGAN SEED POLYPHENOLS BY	
ACID PRECIPITATION	43
 3.1 Introduction.....	43
3.2 Materials and Apparatus.....	43
3.2.1 Reagents.....	43

3.2.2 Apparatus	43
3.3 Methods.....	43
3.3.1 Concentration of the Extracts.....	43
3.3.2 Influence of Concentration Multiples to Acid Precipitation	44
3.3.3 Acid Precipitations Using Different Acid.....	44
3.3.4 UV Absorption Spectrum.....	44
3.3.5 HPLC Analysis.....	44
3.3.6 Influence of pH to Acid Precipitation	45
3.3.7 Isolation of Precipitation Fragments with pH Controlling.....	45
3.4 Results and Discussion.....	46
3.4.1 Influence of Concentration to the Polyphenol Content.....	46
3.4.2 Effect of Concentration on the Acid Precipitation Process	46
3.4.3 Effect of Acid Types on the Acid Precipitation Process.....	48
3.4.4 Comparison of UV Absorption Spectrum.....	49
3.4.5 HPLC Analysis.....	50
3.4.6 pH Changes During Acid Precipitation.....	51
3.4.7 Comparison of UV Absorption Spectrum of Different Precipitation Fragments	52
3.4.8 Comparison of Different Precipitation Fragments by HPLC Analysis	53
3.5 Conclusions.....	55
 CHAPTER IV PRELIMINARY IDENTIFICATION AND ANTIOXIDANT	
ACTIVITY ANALYSIS OF LONGAN SEED POLYPHENOLS	56
4.1 Introduction.....	56
4.2 Materials and Apparatus.....	56
4.2.1 Reagents.....	56
4.2.2 Apparatus	56
4.3 Methods.....	56
4.3.1 Treatment of Separated Products	56
4.3.2 Determination of Total Carbohydrate Content.....	56
4.3.3 Determination of Protein Content	57

4.3.4 Determination of Flavonoid Content	57
4.3.5 Determination of Total Antioxidant Capacity	57
4.3.6 Infrared Spectroscopy Analysis	58
4.3.7 Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis.....	58
4.3.8 Assay of ABTS Cation Radical-scavenging Capacity.....	58
4.3.9 Assay of DPPH Radical-scavenging Capacity	59
4.3.10 Assay of Hydroxy Radical-scavenging Capacity	59
4.4 Results and Discussion.....	59
4.4.1 Yield of Polyphenol Extract and Assay of Components Content and Antioxidant Capacity	59
4.4.2 Comparison of Different Components and Antioxidant Capacity of Different Precipitate Fractions.....	60
4.4.3 Correlation between FRAP Value and Polyphenol Content.....	61
4.4.4 Infrared Spectroscopy Analysis of Longan Seed Extract.....	62
4.4.5 Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Longan Seed Extract	64
4.4.6 ABTS Cation Radical-scavenging Capacity of Longan Seed Extract.....	65
4.4.7 DPPH Radical-scavenging Capacity of Longan Seed Extract	67
4.5 Conclusions.....	68
CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS.....	69
REFERENCES.....	71
APPENDIXES	85
PUBLICATIONS AND PATENTS	92
ACKNOWLEDGEMENTS	93

第一章 文献综述

1.1 龙眼概述

1.1.1 龙眼简介

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.), 又名益智果, 俗称桂圆, 为无患子科龙眼属植物。自古以来, 龙眼就被誉为岭南佳果, 更有北人参, 南龙眼之称, 作为久负盛名的滋补佳品, 明李时珍在《本草纲目》中对其有“食品以荔枝为贵, 而资益则以龙眼为良”^[1] 的评价, 而现今龙眼已为我国卫生部法定的药、食两用果物^[2]。龙眼的花、叶、核和果肉都可入药, 其中花可温肾利尿, 叶能泻火解毒, 核有止血定痛、理气化湿的疗效, 而果肉除了较高的营养价值外, 还具有益心脾、补气血、安神益智的功效, 宋《本草图经》中有“甘平无毒, 主治五脏邪气, 安志压食, 久服强魄聪明, 轻身不老, 通神明”^[3]的描述, 明《滇南本草》中也有“养血安神, 长智敛汗, 开胃益脾”^[4]的评价。现代生物医学研究已表明, 从龙眼的壳、核和果肉中得到的提取物具有良好的抗氧化、抗糖化和抑制酪氨酸酶的能力以及潜在的抗癌活性^[5-8], 因此龙眼确实可谓浑身是宝。

龙眼原产于我国岭南(现两广、海南及越南北部一带), 如今在东南亚的亚热带地区, 泰国、越南和马来西亚等国以及我国的广东、广西、福建、海南和台湾等省都有广泛的栽培^[9]。龙眼在我国栽培面积和年产量均居世界首位, 2010年我国的龙眼产量为 131.2 万 t, 其中作为主产区之一的福建省的龙眼产量已达到 24.1 万 t, 占全国总产量的 18.4 %^[10]。福建龙眼以品种多且品质佳而著称, 品种中以漳州和泉州的“福眼”、莆田的“乌龙岭”、厦门的“水涨”和“凤梨穗”最为出名^[11]。

龙眼作为福建重要的经济果物之一, 由于保鲜困难, 除供本省及周边地区的鲜食外, 还大量加工为以龙眼干、肉为主的另包括龙眼酒、膏、果汁和果茶等的各种深加工产品^[12], 因此也延伸出了大批的龙眼加工企业。其中龙眼干、肉是最传统的龙眼加工产品, 深受广大消费者的喜爱, 已具有良好的市场规模及认知度, 而其他各具特色的龙眼深加工产品, 也活跃在一些特定的消费领域如餐饮酒

水、旅游特产和节日礼品等。所以龙眼果物的深加工可以说是增加果农收入，拓展农产企业创新的重点发展方向之一，已引起了各农产科研、加工单位以及各方投资者的广泛关注。

1.1.2 龙眼核简介

龙眼核为龙眼果实的种仁，具有红褐色的光润表皮，圆滑的类球形外形，质地坚硬，香气微弱，内部为两片灰褐色子叶，有淡苦涩味，重量约占龙眼果实鲜重的 15~17 %^[13]。福建农林大学的刘释文^[14]对龙眼核的主要成分进行了分析其结果显示龙眼核中的淀粉含量为 60.88 %，还原糖含量为 9.67 %，粗纤维含量为 6.85 %，蛋白质含量为 5.58 %，果胶含量为 5.19 %，多酚含量为 4.72 %，脂肪含量为 3.23 %。另据肖更生等^[15]的报道龙眼核还含有多种矿物元素，维生素，氨基酸等营养成分。

在龙眼果物的深加工过程中，被视为加工废料的龙眼核被大量废弃，例如，仅泉州，漳州两市的大型龙眼加工基地，其龙眼鲜果肉和肉干的年生产量就超过万吨，废弃的龙眼核就在千吨以上，而整个福建龙眼加工行业的废弃龙眼核保守估计也应在万吨以上，因此龙眼核废料具有废弃量大且可集中回收的特点。

目前，大量龙眼核废料在造成环境污染的同时还使得龙眼核这一有回收利用价值的资源遭到了白白的浪费。这主要是因为至今还没有一种科学有效的资源利用方法，可以用来处理大批量回收来的废弃龙眼核。因此开发出一套有效回收利用废弃龙眼核中高附加值天然产物的工艺方法，既符合现代化循环经济的需求，更对农产加工企业的产业结构升级以及新农村的建设有着良好的促进作用。

1.2 龙眼核的研究现状

近年来国内对于龙眼核利用的研究主要集中在，提取其中的淀粉、脂肪酸、多酚等天然产物，并探究其潜在的生物活性和应用价值^[16]。而国外研究多集中于对其中最具生物活性的多酚类物质的分离纯化、结构鉴定及其抗氧化、抗癌能力的探讨^[17]。

1.2.1 龙眼核淀粉的提取利用

李秀娟等^[18]提出了一种龙眼核淀粉提取和纯化的工艺，并对龙眼核淀粉的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库